

COMPLEXES A BASE DE STRONTIUM, COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET  
PRODUITS DIETETIQUES

La présente invention concerne des complexes organiques à base de sitostérols, d'acylglycérols et de strontium et leur utilisation dans le domaine pharmaceutique et l'industrie diététique. Elle a trait également à des méthodes pour traiter diverses maladies, en particulier des maladies osseuses et sanguines, par administration de ces complexes. Elle concerne aussi des compositions pharmaceutiques contenant ces complexes, en particulier pour traiter les maladies osseuses, telles que l'ostéoporose, et pour traiter des hémopathies.

Les acylglycérols, plus particulièrement les acylglycérols d'acides gras, sont présents dans la plupart des végétaux et sont des constituants majoritaires des corps gras végétaux et animaux. Seuls varient d'un acylglycérol à l'autre le nombre d'acides gras, leur position sur le glycérol, leur longueur de chaîne et le nombre de leurs éventuelles insaturations. Il peut s'agir, en particulier, de mono-, di- ou triacylglycérols. Le sitostérol, dont il existe deux isomères actifs le  $\gamma$  et le  $\beta$  sitostérol, est, lui aussi, un constituant de l'ensemble des végétaux. Certains extraits totaux de plantes qui, comme la majorité des plantes, contiennent parmi leurs très nombreux constituants des flavonoïdes, tannins, saponines, coumarines, alcaloïdes, triterpènes, stérols, carbohydrates et/ou glycosides ont été décrits pour leur activité thérapeutique, en particulier hypoglycémiant, comme par exemple l'extrait d'accacia (Egypt. J. Pharm. Sci., 1992, 33 (1-2), 327-340), ou l'extrait de teucrium oliverianum (Fitoterapia, 1984, 55(4), 227-230). Aucun lien entre l'activité et la fraction contenant les stérols n'est établi. Les travaux des auteurs de la présente demande les ont déjà conduit à décrire, dans différents brevets, différentes associations, en particulier sous forme de complexes organométalliques utilisables dans le traitement et/ou la prévention de l'hyperglycémie, du diabète et des maladies connexes. On citera en particulier la demande de brevet WO 96/23811 qui décrit des complexes organométalliques à base de sitostérols et d'acylglycérols, le métal étant en particulier le vanadium.

L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une masse osseuse faible et une détérioration du tissu osseux, conduisant à une fragilité osseuse et ainsi à une augmentation du risque de fractures des os. L'ostéoporose peut toucher l'ensemble du squelette et cause des fractures essentiellement au niveau de la hanche, du poignet ou du rachis dorsal ou lombaire. L'ostéoporose est un problème de santé publique majeur et global, accru par le

vieillessement de la population. En outre, même si l'ostéoporose est souvent reliée aux personnes de plus de 50 ans, cette maladie peut arriver à tout âge. Certains facteurs sont liés au développement de l'ostéoporose ou contribuent à la probabilité de développer cette maladie, on les appelle les facteurs de risque. Ainsi, il est établi qu'une femme est plus susceptible d'être atteinte de cette maladie qu'un homme, il en est de même pour les personnes âgées, les os devenant moins denses et donc plus fragiles avec l'âge, pour les personnes fines et/ou de petites tailles, etc. Chez l'adulte, le capital osseux est la résultante de l'équilibre entre la résorption osseuse par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes jusqu'à l'âge de 30 ans, la densité osseuse commençant à diminuer à partir de cet âge. A la ménopause, la perte osseuse chez la femme est accélérée avec la déficience en œstrogène qui augmente l'activité des ostéoclastes, conduisant alors à une résorption osseuse plus importante que la formation osseuse. L'aménorrhée, les taux bas en œstrogène, le taux bas en testostérone chez l'homme, l'anorexie, certains traitements médicamenteux (tels que les glucocorticoïdes, certains anti-convulsifs), un régime alimentaire à faibles doses en calcium et vitamine D, le tabagisme ou l'usage excessif d'alcool sont des facteurs de risque supplémentaires.

Un certain nombre de traitements thérapeutiques préventifs ou curatifs contre l'ostéoporose sont décrits ou actuellement utilisés, tels que des biphosphonates, la calcitonine, des traitements hormonaux (œstrogène et progestin), des modulateurs sélectifs au récepteur à l'œstrogène (raloxifène).

Un nouveau médicament en cours d'enregistrement dans le traitement de l'ostéoporose utilise le strontium comme principe actif. Ainsi, certaines publications, notamment Reginster J.-Y., Current Pharmaceutical Design, 2002, 8, 1907-1916, décrivent l'activité du ranelate de strontium dans le traitement de l'ostéoporose. Une étude de deux ans en double aveugle sur des femmes post-ménopausées ayant pris une dose de 2g/jour de ranelate de strontium a montré une augmentation significative de la densité minérale osseuse au niveau des vertèbres lombaires. En outre, il a été observé, durant cette étude, que la phosphatase alcaline osseuse (marqueur de la formation osseuse) a augmenté de manière significative et qu'un marqueur de la résorption osseuse a diminué, ceci montre que le ranelate de strontium joue sur les deux activités biologiques, ce qui aboutit à une augmentation de la densité osseuse.

Des travaux réalisés avec le chlorure de strontium (strontium chloride) et avec le ranelate de strontium ont démontré une double action sur les effecteurs cellulaires de l'équilibre osseux:

stimulation de la multiplication des ostéoblastes, et inhibition de la multiplication des ostéoclastes.

L'activité thérapeutique chez l'animal nécessite des doses élevées de strontium (200 mg de ranélate de strontium/jour, correspondant à 68,2 mg de strontium métal) et s'accompagne  
5 d'une fixation de strontium dans l'os relativement importante, avec un turn-over d'élimination qui induit un effet toxique (lyse ostéomalacique de l'os) à partir de 800 mg/jour de ranélate (4 fois la dose active). Cet effet délétère de fixation de strontium dans l'os n'est pas considéré en deçà de ces doses comme toxique car il n'altère pas les qualités mécaniques de l'os.

10 Toutefois, il apparaît, selon certains auteurs, que le strontium peut avoir des effets néfastes lorsque la quantité fixée dans l'os devient trop élevée, en particulier lors d'une altération de la fonction rénale (Martine Cohen-Solal, *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17 [Suppl. 2] : 30-34).

15 Des travaux récents ont démontré qu'il existait une corrélation entre le nombre d'ostéoblastes et le nombre de cellules souches hématopoïétiques. Les procédés induisant une augmentation du nombre des ostéoblastes induit une augmentation simultanée des cellules souches hématopoïétiques ("Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche", Calvi L.M. et al., *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):841-6. et "Identification of the  
20 haematopoietic stem cell niche and control of the niche size", Zhang J. et al., *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):836-41).

La stimulation de la reproduction des ostéoblastes par le strontium est donc susceptible d'induire une stimulation des cellules souches hématopoïétiques.

25 Disposer d'un actif pharmaceutique utilisable à plus faibles doses, tout en présentant une activité pharmacologique au moins équivalente à celle des sels de strontium utilisés à ce jour, serait d'un grand intérêt thérapeutique (diminution des risques néfastes) et économique.

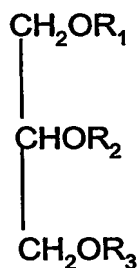
30 La présente invention propose donc de nouveaux complexes organiques à base de sitostérols, d'acylglycérols et de strontium permettant d'augmenter la biodisponibilité du strontium. Les auteurs de la présente invention ont en effet constaté qu'en administrant à un animal des complexes organiques particuliers contenant du strontium, une croissance

osseuse est constatée, même à de faibles doses en strontium, tout en présentant une moindre fixation du strontium à l'os.

La présente invention a donc pour objet, selon un premier aspect, de nouveaux complexes

5 organométalliques susceptibles d'être obtenus par réaction de:

- Au moins un cation de strontium,
- Le sitostérol ou un extrait végétal en contenant,
- Au moins un mono-, d'un di- ou d'un triglycéride répondant à la formule (I):



10

dans laquelle:

-R1 est un reste acyle d'acide gras en C14 à C24 saturé ou non, linéaire ou ramifié, un atome d'hydrogène, ou un mono-, un di- ou un tri- galactose ou glucose,

-R2 est un reste acyle d'acide gras en C2 à C18, linéaire ou ramifié, saturé ou non,

15 -R3 est un reste acyle d'acide gras en C14-C24 saturé ou non, linéaire ou ramifié, ou un atome d'hydrogène.

Selon une variante préférée, l'un au moins des groupements R1 ou R3 de la formule (I) ci-dessus est constitué d'un reste acyle d'acide oléique (C18: 1[cis]-9).

20 Selon une autre variante préférée, R2 présente une insaturation, de préférence il est un reste acyl d'acide gras en C18, avantageusement il représente un reste d'acide oléique ou d'un de ses isomères de position de la double liaison (cis-6, 7, 9, 11, 12 et 13) ou d'un de ses isomères isoramifiés.

Selon une autre variante, R2 représente un groupe acétyle.

25 Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, R3 de la formule (I) ci-dessus représente l'atome d'hydrogène.

Les complexes de l'invention se forment relativement aisément par mélange des trois types de constituants en les maintenant généralement à une température comprise entre 30°C et

40°C pendant une douzaine d'heures ; la réaction catalytique de fabrication du complexe se fait de façon plus lente à température ambiante (5 à 8 jours à 25°C) ; le complexe ne se fabrique que peu ou pas si le mélange est maintenu au froid.

- 5 Ainsi donc, la demanderesse a clairement mis en évidence l'effet favorable d'une élévation de température, en particulier entre 30 et 40°C, sur la réaction intervenant entre les constituants du complexe de l'invention.

- 10 Les trois types de composés réagissent très aisément, par leur mise en solution dans un solvant organique, par exemple le dichlorométhane, l'éther, le chloroforme, le méthanol, l'éthanol ou l'acétate d'éthyle qui seront évaporés par la suite.

- 15 Le cation du strontium utilisable pour préparer les complexes selon l'invention est donc un cation divalent susceptible de se complexer avec les deux types de dérivés organiques ci-dessus. A titre d'exemples de sels de strontium susceptibles d'être utilisés dans la présente invention pour fournir le cation de strontium, on peut notamment citer les dihalogénures, plus spécifiquement le dichlorure, les sulfates, les hydrates, qui peuvent être avantageusement dissous dans l'eau ou parfois dans des alcools. On peut encore citer des dérivés organiques de strontium comme les acétylacétonates, les alcoolates, en particulier le  
20 ranélate de strontium, ou des complexes de strontium avec des solvants organiques, par exemple des éthers, le THF, la DMF. Ces dérivés organiques de strontium sont généralement solubles dans des solvants organiques, plus particulièrement dans des solvants chlorés comme le chloroforme ou le dichlorométhane.

- 25 Le sitostérol utilisé pour la préparation des complexes de l'invention peut être sous forme  $\beta$  ou  $\gamma$ . On peut également utiliser un mélange de ces deux stérols.

- 30 Le sitostérol existe sous forme commerciale. Mais il est alors généralement en mélange avec du campestérol. Dans ces produits commerciaux généralement extraits du soja, le  $\beta$ -sitostérol ne représente que 50% du produit, l'impureté principale étant le campestérol. Une autre origine commerciale intéressante est obtenue à partir du tall-oil, dans laquelle le sitostérol représente plus de 75 % du produit. On pourra obtenir du  $\beta$ -sitostérol présentant une pureté supérieure à 95 %, voir même de 99 %, en procédant de la façon suivante : on fait plusieurs recristallisations successives à l'acétone du mélange commercial, ce qui

permet de prépurifier le  $\beta$ -sitostérol par élimination du campestanol et du sitostanol présents dans le mélange. Puis, on fait subir au produit ainsi prépurifié 1 à 3 étapes de purification par chromatographie liquide haute pression sur colonne préparative C18 en utilisant des mélanges éluants, tels que le méthanol, en particulier du méthanol à 100 % ou des mélanges de méthanol et d'acétonitrile, en particulier des mélanges 80-20 ou tout mélange intermédiaire permettant d'obtenir le sitostérol avec une pureté supérieure à 95 voir même à 99 %. Cette pureté est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

On peut également préparer le sitostérol par extraction à partir de végétaux selon des techniques décrites dans la littérature, par exemple P95 de la thèse présentée à Montpellier par Claude Cerdon ayant pour titre : « Modulation de la production de sapogénines stéroïdiques en réponse à l'inhibition de la synthèse de stérols ».

Cette extraction est avantageusement réalisée par complexation des métaux selon le procédé décrit en particulier dans le brevet français N°. 2 316 247 dans lequel est décrit un procédé pour isoler les 3-hydroxystéroïdes et les 3 oxostéroïdes de mélange contenant ces composés.

Pour réaliser cette extraction, on pourra utiliser tout végétal ou produit d'origine végétale connu pour sa teneur relativement élevée en sitostérol.

A titre d'exemples de végétaux ou de produits d'origine végétale à teneur relativement élevée en sitostérol libre, on citera en particulier l'huile d'olive, l'huile de soja, les feuilles de coton, les feuilles de café, les germes de blé.

Il faut préciser cependant que la fraction sitostérol libre contient une proportion variable selon les végétaux des isomères 24 R et 24 S, proportion mal connue car peu ou pas étudiée, et qui paraît expliquer une meilleure activité relative de la fraction stérol de certains végétaux et surtout l'excès de sitostérol nécessaire lors de la fabrication des nouveaux produits.

Les acylglycérols de formule (I) utiles pour la préparation des complexes selon l'invention peuvent être isolés dans la plupart des végétaux.

Plus généralement, la fraction chimique contenant ces produits peut être extraite de labiées, ortie (*urtica dioica* et *urens*), de la sauge, les bugles, la luzerne ou alfalfa (*medicago sativa*), les eucalyptus (*globulus*, *delegatensis*), l'*angelica archangelica* et l'*angelica sinensis*, les ombellifères, le *gymnema sylvestre* (*asclepiadaceae*), le *marsdenia condurango*, le  
5 *momordica charantia*, le ginkgo biloba, le chardon-marie, le thé vert, le thé noir (*camelia sinensis*), la rhubarbe, le *dioscorea dumetorum* (*dioscoreaceae*), l'*indigofera arrecta* (*papilionaceae*), le *pittosporaceae*, l'*agrimonia eupatoria*, le curcuma *xanthorrhiza* (*roxb.*), l'*uncaria gambier* (*roxb.*), le *swertia chirayita* (*roxb.*), les résédacées (*réséda*, *phyteuma*, *lutea*, *alba*, *luteola*), l'*harpagophytum*, les rubiacées, les *gentianx*caes, l'*asparagus*  
10 *racemosus*, le *dioscorea durnetorum* (*dioscoraceae*), l'aubépine (*crataegus oxyacantha*), le gui (*viscum album*), les palétuviers (*rhizophoracées*), les palmiers, le kaki, les chênes, le chêne à galle (*fagacées*), les ronces, l'hamamélis (*hamamélidacées*), le *ratanhia* (*kramériacées*), le salicaire (*lythracées*), le *calophyllum* (*clusiacées*), les acacias, l'acacia à cachou (*Légumineuses mimosoidées*), le quebracho (*anacardiaceae*), les raisins (*vitis*  
15 *vinifera*, *ampelidacées*), les cassis (*saxifragacées* dont *ribes nigrum*), les myrtilles (*erieae*ées), les mûres (*rubus fruticosus*), le sureau, le choux-rouge, l'ail (*allium sativum*), le coriandre (*coriandrum sativum*), le juniper (*juniperus communis*), les pins (*abiétacées*), le pin maritime, les cyprès (*cupressacées*), les hibiscus, les rhus (*anacardiaceae*), les dicotylédones, les fougères, les gymnospermes, les *melianthus*, les rosacées, les roses,  
20 l'*eriobotrya japonica* (*rosaceae*), le *boussingaultia baselloides*, le *malva verticillata* (*malvaceae*), les fraisiers, les citrus (*rutacées*), la benoite, le *blighia sapida* (*sapindaceae*), l'aubépine, les châtaigniers (*fragacées*), les sumacs (*anacardiaceae*), les myrabolans (*combrétacées*), la bistorte, les légumineuses *césalpinioïdées* (*dividivi*, *tara*, *algarobille*), les légumineuses papilioncées (*derris*, *lonchocarpus*, *mundelea*, *tephrosia*), le *lespedeza*, le  
25 *sophora*, les *polygonacées*, les légumineuses, le sarrasin.

On utilise de façon particulièrement avantageuse comme source d'acylglycérols des huiles végétales insaturées, en particulier de l'huile d'olive de première pression à froid.

30 D'une façon générale, on choisira comme source d'acylglycérols utiles selon l'invention une huile ou une fraction d'huile contenant une forte teneur en acide oléique, une telle huile contenant généralement une forte proportion d'acylglycérols utiles selon l'invention.

A titre d'exemples de telles huiles, on citera:

- l'huile d'olive dont la teneur en acide oléique (C18: 1) est comprise entre 60 et 80 %, les huiles européennes étant plus riches en C1g: 1 que les huiles d'Afrique du Nord,
- l'huile de tournesol de variété dite hybride tournesol oléique, contenant 83 % de C18:1 au lieu de 16 % dans l'huile de tournesol normale,
- 5 - l'huile de carthame de variété oléique, contenant de 73 à 80 % de C18:1 au lieu de 10 à 20 % dans la variété linoléique,
- l'huile d'amande contenant de 64 à 82 % de C18:1,
- l'huile de noisette contenant de 66 à 83 % de C18: 1,
- l'huile d'avocat dont la teneur en C18:1 varie entre 36 et 80 %.

10

La fraction contenant des acylglycérols utiles pour préparer les complexes selon l'invention peut être avantageusement préparée à partir de l'huile d'olive de la façon suivante : on effectue une prépurification de l'huile d'olive en la passant sur une faible hauteur de silice (10 à 15 cm), en réalisant le vide et en éluant à l'aide d'un solvant organique tel que le  
15 dichlorométhane ou un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle dans des proportions 96/4 ou tout autre éluant présentant une polarité voisine, de façon à isoler les triglycérides présents dans l'huile parmi lesquels on trouve celui présentant un C18 sur le C en position 2 du glycérol. La silice est ensuite lavée avec de l'acétate d'éthyle afin de récupérer les monoglycérides et les diglycérides intéressants selon l'invention, c'est-à-dire ceux  
20 comportant un acide gras en C18 sur le carbone en position 2 dans le groupement glycérol.

25

La fraction ainsi obtenue est ensuite passée sur une colonne de silice et éluee avec différents gradients de mélange acétate d'éthyle/cyclohexane compris entre 10/90 et 100/0 de façon à séparer les différentes familles chimiques de l'huile et à récupérer la famille active  
recherchée.

Selon un aspect particulier de l'invention, les acylglycérols utilisés dans la cadre de la présente invention sont choisis parmi le 1,2-dioléine et 1-oléoyl-2-acétyl glycérol.

30

Les acylglycérols de l'invention sont également disponibles commercialement. En particulier, le 1-oléoyl-2-acétylglycérol et le 1,2-dioléoylglycérol sont disponibles commercialement à un taux de pureté élevé (plus spécifiquement, le monooléate de glycérol contenant environ 44 % de glycérides dioléiques, parmi lesquels environ 14 % est le 1,2-dioléine). Un tel composé est accepté pharmaceutiquement (*European Pharmacopeia* (4<sup>th</sup>



Edition), *USP 25/NF20*, et *Japanese Standard of food Additives*) et est notamment commercialisé par la société Gattefossé sous le nom PECEOL®.

Les complexes selon l'invention sont, comme on l'a vu précédemment, aisément fabriqués par simple mélange des trois types de composés décrits ci-dessus. Ce mélange est avantagement réalisé dans un solvant organique tel que le dichlorométhane, l'éther, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le mélange est ensuite maintenu à une température comprise entre 30°C et 40°C pendant une douzaine d'heures, et une durée inférieure lorsque l'on associe une agitation du mélange.

On utilise avantagement des proportions équimolaires des deux constituants lipidiques ; toutefois, ces conditions ne sont pas critiques, et l'on pourra avantagement utiliser un excès de sitostérol par rapport à l'acylglycérol dans des proportions de 1 à 50 en fonction de la nature du stérol (24 R ou 24 S).

Le métal (strontium) peut être utilisé à doses très basses par rapport aux deux autres constituants, en particulier dans un rapport de 1/10 à 1/100 exprimé en moles par rapport à l'acylglycérol.

Les différents constituants sont formellement identifiés par des moyens analytiques adaptés:

- pour le sitostérol: chromatographie en phase gazeuse,
- pour l'acylglycérol HPLC avec un détecteur à diffusion de lumière, sur une colonne de kromasil C18, en présence d'un éluant constitué par exemple d'acétonitrile isocratique.

On peut également utiliser la chromatographie en phase gazeuse pour l'identification des monoglycérides.

Le pic de masse du complexe n'est généralement pas détectable avec les méthodes usuelles, telles que l'ionisation chimique et l'impact électronique, ce qui peut s'expliquer par le fait que les complexes formés par ces deux constituants avec le métal sont généralement instables comme la plupart des complexes organométalliques ayant une activité biologique.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne l'utilisation des complexes décrits précédemment en tant qu'agents transporteurs de cations du strontium, les ligands liés au strontium servant à accroître la biodisponibilité dudit strontium.

Une telle application est d'autant plus importante que, d'une façon générale, l'homme du métier sait que la difficulté d'utilisation thérapeutique du strontium peut être liée à sa toxicité au delà des doses actives.

5

Les complexes organométalliques de strontium, décrits selon l'invention, permettent d'obtenir une activité de croissance osseuse au moins équivalente à celle du dichlorure de strontium à des doses de strontium (exprimée en métal) 10, voire 100 à 500 fois plus faibles que celle utilisée dans le cas du dichlorure de strontium. De plus l'activité pharmacologique est obtenue avec une moindre fixation du strontium dans l'os. On peut alors affirmer qu'à ces doses, le strontium sous forme de complexe est dénué de toxicité.

10

Les complexes organométalliques décrits dans la présente invention optimisent ainsi la biodisponibilité du strontium transporté, permettant son utilisation thérapeutique avec une efficacité renforcée une toxicité faible ou nulle, ce qui présente un avantage considérable par rapport à l'état de la technique.

15

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne également des compositions pharmaceutiques contenant au moins un complexe tel que défini précédemment et un véhicule, excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

20

Comme excipient, véhicule ou support pharmaceutiquement acceptable, on peut utiliser tout excipient, véhicule ou support bien connu de l'homme de l'art. On peut citer, par exemple, et de façon non limitative: le lactose, l'amidon de maïs, le glucose, la gomme arabique, l'acide stéarique ou le stéarate de magnésium, la dextrine, le mannitol, le talc, les huiles d'origine naturelle riches en acides gras insaturés essentiels et en stérol. En particulier, si cela s'avère éventuellement nécessaire, on peut utiliser d'autres additifs bien connus de l'homme de l'art tels que des stabilisants, des desséchants, des liants, des tampons de pH.

25

Les compositions de l'invention peuvent être administrées de différentes manières, en particulier par voie intramusculaire, sous-cutanée, sublinguale, per os, permuqueuse, transdermique (en administrant la composition sous forme de patch ou de gel).

30

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne l'utilisation des complexes de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé comme agent régulateur ou stimulant de la croissance osseuse, en particulier dans le traitement ou la prévention des déficits ou des dysfonctionnements de la croissance osseuse, notamment dans le traitement ou la prévention de l'ostéoporose.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne l'utilisation des complexes de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé pour stimuler la fabrication de cellules souches hématopoïétiques, en particulier dans le traitement des pathologies sanguines s'accompagnant d'un déficit hématopoïétique, plus spécifiquement en complément des chimiothérapies anticancéreuses.

L'invention concerne également une méthode de traitement des pathologies ou désordres cités ci-dessus, comprenant l'administration à un sujet, notamment humain, d'une dose efficace d'un complexe ou d'une composition pharmaceutique tels que définis ci-avant.

Les dosages et les régimes dans lesquels le complexe est administré varient selon la formulation, le mode d'administration, les conditions et les particularités du sujet à traiter. A titre de comparaison, le ranélate de strontium peut être administré à un animal dans des quantités qui varient entre environ 200 et 1 800 mg/Kg/jour. Chez l'homme, la quantité de ranélate de strontium nécessaire pour obtenir une activité thérapeutique est de 2 g/jour. Lorsque le strontium est lié au complexe décrit dans l'invention nécessaire pour obtenir une activité thérapeutique sont divisées par 10 à 100, du fait d'une meilleure biodisponibilité du métal.

A cet égard, les termes "traitement" ou "traiter" incluent des traitements aussi bien curatifs que prophylactiques. Le complexe selon l'invention peut être utilisé à un stade précoce de la maladie, ou avant l'apparition des premiers symptômes, ou encore à un stade avancé de la maladie.

Dans toutes ces utilisations, on met en application le fait que la biodisponibilité du strontium lui-même connu comme stimulant de la croissance osseuse se trouve accrue du fait de sa complexation.

La complexation conduit dans tous les cas à une exaltation du pouvoir biocatalytique du strontium, ce qui permet d'obtenir une activité avec des doses de strontium considérablement diminuées par rapport aux doses habituellement utilisées.

- 5 Selon un autre de ses aspects particulièrement important, l'invention concerne également des produits diététiques, notamment des produits diététiques utilisables comme compléments alimentaires à activité régulatrice du métabolisme du calcium et/ou protectrice de la dégradation osseuse, en particulier de la densité et/ou de la qualité osseuse, incorporant les complexes précédemment définis ainsi qu'un mode de préparation de ces produits.

10

En effet, étant donné le mode de préparation des complexes décrits précédemment, ils peuvent se former aisément par addition, dans une huile riche en acides oléiques (C18: 1), de sitostérol ou un extrait végétal contenant au moins l'une de ces deux formes de sitostérol et d'un sel de métal tel que défini précédemment.

15

Comme on l'a vu précédemment, les teneurs en acide oléique C18: 1 des huiles végétales varient considérablement selon la nature du végétal et son origine géographique.

20

Pour la préparation des produits diététiques selon l'invention, on utilise avantageusement une huile végétale dans laquelle les acides oléiques représentent au moins 60 % des acides gras.

25

Selon une variante préférée, on utilisera de l'huile d'olive, de préférence de l'huile de première pression à froid.

Le sitostérol sera avantageusement introduit sous forme d'un extrait végétal. On pourra, en particulier, utiliser un extrait végétal du commerce obtenu à partir du soja ou du tall-oil.

30

Le produit diététique est obtenu par simple mélange de l'huile, de l'extrait végétal riche en sitostérol et du cation de strontium, puis chauffage et éventuellement agitation du mélange.

A titre d'exemple de tels produits diététiques selon l'invention, on citera les mélanges constitués de:

- 100 ml d'huile dont les acides gras ont une teneur d'au moins 60 % en acides oléiques, en particulier de l'huile d'olive,
- 20 g de sitostérol extrait du tall-oil,
- 2 à 8 g de sel de strontium exprimé en poids de métal

5

Ce produit administré quotidiennement à raison de 5 ml per os permet une meilleure régularisation du métabolisme du calcium et une prévention de la dégradation osseuse (densité et/ou qualité). Un tel traitement diététique est particulièrement indiqué dans le cas des femmes post-ménopausées en prévention des fractures vertébrales et osseuses.

10

Les exemples suivants sont donnés à titre purement illustratif de l'invention.

### EXEMPLES

#### 15 Exemple 1 : Préparation du complexe selon l'invention

1,70 g de sitostérol commercial dissout dans 10 ml d'éthanol.

100 mg d'un mélange commercial de 1,2-dioleïne et 1,3 dioleïne.

840 mg de strontium sous forme de sulfate solubilisé dans 5 ml d'eau purifiée.

70 ml d'huile de soja.

20 Le mélange est agité et chauffé pendant 30 minutes. L'éthanol est ensuite évaporé.

#### Exemple 2: Préparation du complexe selon l'invention

1,70 g de sitostérol commercial dissout dans 10 ml d'éthanol.

840 mg de strontium sous forme de sulfate solubilisé dans 5 ml d'eau purifiée.

25 2 ml d'un extrait purifié de mono et diglycérides extraits de l'huile de palme-palmiste (70 à 80 % d'acide oléique).

Le mélange est agité et chauffé pendant 30 minutes à 35°C. L'éthanol est ensuite évaporé.

#### Exemple 3: Préparation d'une composition pharmaceutique selon l'invention

30 Une composition pharmaceutique est préparée à partir du complexe formé selon l'exemple 2. Le produit est introduit dans des capsules gastro-résistantes. Le produit est ensuite administré.

**Exemple 4: Préparation d'une composition pharmaceutique selon l'invention**

Une composition pharmaceutique est préparée à partir du complexe formé selon l'exemple 1. Le produit est liquide et se présente sous la forme d'une émulsion. Il est prêt à être administré *per os* chez l'homme, ou via la voie IP ou la voie rectale chez l'animal.

5

**Exemple 5: Préparation d'une composition pharmaceutique oro-dispersible selon l'invention**

Une composition pharmaceutique est préparée à partir du complexe formé selon l'exemple 2 en rajoutant au mélange des excipients adaptés à cette forme pharmaceutique.

**10 Exemple 6: Tests Pharmacologiques**

Le complexe selon l'exemple 4 est évalué selon le protocole suivant:

Administration chez le rat Wistar femelle de poids 200 g.

Nombre d'animaux: 30.

Nombre d'animaux par lot: 6 et 8.

15	Identification des Lots:	Lot #1 = Contrôle (émulsion huileuse)	C (n=6),
		Lot #2 = Contrôle Chlorure de Strontium	SrCl (n=8)
		Lot #3 = Traité NP05 faible dose	NP05-f (n=8)
		Lot #4 = Traité NP05 dose élevée	NP05-F (n=8)

**Traitement**

20	Complexe Testé:	NP05 (composition fabriquée selon l'invention, dans laquelle varie uniquement la quantité de strontium):
----	-----------------	--

Principe Actif: Strontium.

Préparation: selon l'exemple 4

Dosage principe actif: **métal Strontium: (mg/kg/j)**

25	C	0
	SrCl	68,2
	NP05-F	68,2
	NP05-f	12,15

Volume d'administration: 2 ml/kg.

30	Voie d'administration:	Voie rectale.
----	------------------------	---------------

Fréquence d'administration: Une fois par jour – toute les 24 heures.

Durée du traitement : 21 jours.

Echantillons de tissus

- L'os du fémur est prélevé, nettoyé de ses adhérences tendineuses et musculaires, puis congelé après euthanasie des animaux.
  - Les os sont ensuite soumis à un dosage du strontium par spectrométrie d'absorption atomique.
- 5
- Le diamètre de l'épiphyse du fémur est mesuré.
  - Le dosage du strontium dans les os est réalisé.

**Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 1 et 2 suivants.**

Tableau 1**Diamètre de la tête de l'os (millimètres)**

Lots	Fémur 1	Fémur 2
Témoins		
T 1	4	4
T 2	3,7	3,7
T 3	4,2	4,2
T 4	4,2	4,2
T 5	4	4
T 6	3,9	4
Moyenne	4,01	
Ecart-type	0,05	
Chlorure de Strontium (68,2 mg/kg)		
Cl 1	4	4
Cl 2	4	4
Cl 3	4	4
Cl 4	4	4
Cl 5	4	4
Cl 6	4	4
Cl 7	4	4
Cl 8	4	4,1
Moyenne	4,01	
Ecart-type	0,01	
NP 05 faible dose (12,5 mg/kg)		
f 1	4,3	4,3
f 2	4,3	4,3
f 3	4	4
f 4	4,4	4,4
f 5	4,1	4,1
f 6	4,2	4,2
f 7	4	4
f 8	4,4	4,4
Moyenne	4,18	
Ecart-type	0,04	
NP 05 dose élevée (68,2 mg/kg)		
F 1	4,3	4,3
F 2	3,9	4
F 3	4,3	4,3
F 4	4,4	4,4
F 5	4	4
F 6	4,4	4,4
F 7	4,3	4,2
F 8	4,2	4,1
Moyenne	4,25	
Ecart-type	0,04	

Stats	T	Cl	f	F
T	-	NS	S	S
Cl	0,968	-	TS	TS
f	0,00468	0,000104	-	NS
F	0,00429	0,000139	0,914	-

**Test de Student**

T non différent de Cl

f non différent de F

f et F différents de T et Cl



Tableau 2

<b>DOSAGE CALCIUM</b>		<b>DOSAGE STRONTIUM</b>	
Echantillon	Concentration en Ca (mg/g)	Echantillon	Concentration en Sr (mg/g)
T1	72,698	T1	100,14
T2	61,893	T2	72,83
T3	78,219	T3	86,60
T4	68,615	T4	72,49
T5	63,916	T5	67,84
T6	61,893	T6	70,57
Moyenne	<b>67,873</b>	Moyenne	<b>78,41</b>
Ecart-type	<b>6,604</b>	Ecart-type	<b>12,48</b>
Cl1	77,882	Cl1	308,32
Cl2	79,211	Cl2	350,27
Cl3	72,946	Cl3	306,08
Cl4	57,229	Cl4	342,23
Cl5	64,538	Cl5	250,72
Cl6	71,630	Cl6	241,67
Cl7	70,192	Cl7	437,51
Cl8	71,221	Cl8	441,82
Moyenne	<b>70,606</b>	Moyenne	<b>334,83</b>
Ecart-type	<b>7,069</b>	Ecart-type	<b>75,18</b>
f1	84,180	f1	176,64
f2	78,618	f2	120,78
f3	66,324	f3	126,75
f4	62,572	f4	102,72
f5	64,209	f5	99,93
f6	73,896	f6	87,04
f7	60,142	f7	109,39
f8	61,336	f8	119,51
Moyenne	<b>68,910</b>	Moyenne	<b>117,84</b>
Ecart-type	<b>8,908</b>	Ecart-type	<b>27,04</b>
F1	69,516	F1	148,20
F2	70,165	F2	194,70
F3	72,865	F3	123,21
F4	53,810	F4	85,91
F5	73,689	F5	190,64
F6	56,494	F6	166,95
F7	72,791	F7	150,51

F8	59,073	F8	141,94
Moyenne	66,050	Moyenne	150,26
Ecart-type	8,185	Ecart-type	35,52

**Commentaires et résultats :**

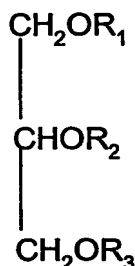
Dans cette étude, la durée de l'administration a été de 3 semaines, et les animaux traités par le dichlorure de strontium n'ont eu aucune action sur leur croissance osseuse, en même temps que la fixation du strontium dans l'os était relativement importante par rapport aux animaux témoins (x 4) ; alors que les études chez l'animal (Optimizing bone metabolism in osteoporosis : insight into the pharmacologic profile of strontium ranelate ; Marie PJ ; *Osteoporos Int* 2003 Mar ;14 Suppl 3 :9-12) ont démontré sur le modèle des rats en croissance une activité de stimulation de la croissance osseuse lorsque l'on administre aux animaux une dose minimum de 68,2 mg de strontium (métal) sous forme de chlorure ou de ranélate pendant une durée de 8 semaines.

Par contre, les animaux traités pendant seulement 3 semaines par le strontium préparé selon l'invention ont eu une croissance osseuse augmentée de façon très significative par rapport aux animaux témoins et au lot traité par le dichlorure de strontium. Dans ces deux lots, l'activité a été obtenue avec une moindre fixation du strontium dans l'os ( x 2 pour le lot avec le même dosage en strontium que le lot dichlorure de Sr, et x 1,5 pour le lot six fois moins dosé en strontium).

REVENDICATIONS

5 1 – Complexes organométalliques susceptibles d'être obtenus par réaction de:

- Au moins un cation de strontium,
- Le sitostérol ou un extrait végétal en contenant,
- Au moins un mono-, d'un di- ou d'un triglycéride répondant à la formule (I):



10

dans laquelle:

-R1 est un reste d'acide acyle gras en C14 à C24 saturé ou non, linéaire ou ramifié, de l'hydrogène, ou un mono-, un di- ou un tri- galactose ou glucose,

-R2 est un reste acyle d'acide gras en C2 à C18, linéaire ou ramifié, saturé ou non,

15 -R3 est un reste acyle d'acide gras en C14-C24 saturé ou non, linéaire ou ramifié, ou un atome d'hydrogène.

2 – Complexes selon la revendication 1, dans lesquels au moins un des groupements R1 ou R3 de la formule (I) ci-dessus est constitué d'un reste acyle d'acide oléique (C18: 1[cis]-9).

20

3 – Complexes selon la revendication 1 ou 2, dans lesquels R<sub>2</sub> présente une insaturation, de préférence il représente un reste d'acide oléique ou d'un de ses isomères de position de la double liaison (cis-6, 7, 9, 11, 12 et 13) ou d'un de ses isomères isoramifiés.

25 4 – Complexes selon la revendication 1 ou 2, dans lesquels R<sub>2</sub> représente un groupe acétyle.

5- Complexes selon l'une des revendications 1-4, dans lesquels R<sub>3</sub> de la formule (I) représente l'atome d'hydrogène.

6- Complexes selon l'une des revendications 1-5, dans lesquels le diglycéride est obtenu par isolement à partir de l'huile d'olive ou une huile riche en acide oléique, ou une fraction d'huile riche en acide oléique.

- 5 7 – Complexes selon l'une des revendications 1-6, dans lesquels le cation de strontium est choisi parmi les dihalogénures, plus spécifiquement le dichlorure, de strontium, les sulfates, les hydrates, des dérivés organiques de strontium comme les acétylacétonates, les alcoolates, en particulier le ranélate de strontium, et des complexes de strontium avec des solvants organiques.

10

8 – Composition pharmaceutique contenant au moins un complexe tel que défini dans l'une des revendications 1 à 7 et un véhicule, excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

- 15 9 - Utilisation de complexes tels que définis dans l'une des revendications 1-7 pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé comme agent régulateur ou stimulant de la croissance osseuse, en particulier dans le traitement ou la prévention des déficits ou des dysfonctionnements de la croissance osseuse, notamment dans le traitement ou la prévention de l'ostéoporose.

20

10 – Utilisation de complexes tels que définis dans l'une des revendications 1 à 7 pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé pour stimuler la fabrication de cellules souches hématopoïétiques, en particulier dans le traitement des pathologies sanguines s'accompagnant d'un déficit hématopoïétique, plus spécifiquement en complément des chimiothérapies anticancéreuses.

25

11 - Produits diététiques contenant au moins un complexe tel que défini dans l'une des revendications 1 à 7.

- 30 12 - Produits diététiques selon la revendication précédente pour la régularisation du métabolisme du calcium et/ou une prévention de la dégradation osseuse (densité et/ou qualité).

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/575 C07J51/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 98/01461 A (CHAPUIS JEAN MARC ; JOUY NICOLAS (FR); MAUREL SANTE (FR); MAUREL JEAN) 15 January 1998 (1998-01-15) page 22 - page 24; claims 1-23	1-12
Y	WO 96/23811 A (CHAPUIS JEAN MARC ; MAUREL SANTE (FR); SAENZ CHRISTIAN (FR); MAUREL JE) 8 August 1996 (1996-08-08) cited in the application page 25 - page 27; claims 1-19	1-12
Y	FR 2 658 186 A (ADIR) 16 August 1991 (1991-08-16) page 11 - page 13; claims 1-9	1-12
Y	US 5 075 336 A (CZERNECKI STANISLAS ET AL) 24 December 1991 (1991-12-24) column 11, line 32 - column 12; claims 1-8	1-12
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex

## \* Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2005

Date of mailing of the international search report

04/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kyriakakou, G

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	<p>REGINSTER J-Y: "Strontium ranelate in osteoporosis" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 8, no. 21, 2002, pages 1907-1916, XP008024667 ISSN: 1381-6128 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/FR2004/002912

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9801461	A	15-01-1998	FR	2750606 A1	09-01-1998
			AT	209657 T	15-12-2001
			AU	3449397 A	02-02-1998
			CA	2295867 A1	15-01-1998
			DE	69708643 D1	10-01-2002
			DE	69708643 T2	01-08-2002
			EP	0912599 A1	06-05-1999
			ES	2170401 T3	01-08-2002
			WO	9801461 A1	15-01-1998
			US	6129924 A	10-10-2000
-----					
WO 9623811	A	08-08-1996	FR	2729956 A1	02-08-1996
			FR	2729957 A1	02-08-1996
			AU	4667096 A	21-08-1996
			WO	9623811 A1	08-08-1996
-----					
FR 2658186	A	16-08-1991	FR	2658186 A1	16-08-1991
-----					
US 5075336	A	24-12-1991	FR	2658816 A1	30-08-1991
			AU	7137691 A	29-08-1991
			CA	2036920 A1	28-08-1991
			EP	0445025 A2	04-09-1991
			IE	910641 A1	28-08-1991
			JP	4211631 A	03-08-1992
			OA	9481 A	15-11-1992
			PT	96889 A	31-10-1991
			ZA	9101401 A	27-11-1991
-----					

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K31/575 C07J51/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 A61K C07J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
Y	WO 98/01461 A (CHAPUIS JEAN MARC ; JOUY NICOLAS (FR); MAUREL SANTE (FR); MAUREL JEAN) 15 janvier 1998 (1998-01-15) page 22 - page 24; revendications 1-23 -----	1-12
Y	WO 96/23811 A (CHAPUIS JEAN MARC ; MAUREL SANTE (FR); SAENZ CHRISTIAN (FR); MAUREL JE) 8 août 1996 (1996-08-08) cité dans la demande page 25 - page 27; revendications 1-19 -----	1-12
Y	FR 2 658 186 A (ADIR) 16 août 1991 (1991-08-16) page 11 - page 13; revendications 1-9 ----- -/--	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 avril 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/05/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kyriakakou, G



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
Y	US 5 075 336 A (CZERNECKI STANISLAS ET AL) 24 décembre 1991 (1991-12-24) colonne 11, ligne 32 - colonne 12; revendications 1-8 -----	1-12
Y	REGINSTER J-Y: "Strontium ranelate in osteoporosis" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 8, no. 21, 2002, pages 1907-1916, XP008024667 ISSN: 1381-6128 cité dans la demande le document en entier -----	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ide Internationale No  
.../FR2004/002912

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9801461	A	15-01-1998	FR 2750606 A1	09-01-1998
			AT 209657 T	15-12-2001
			AU 3449397 A	02-02-1998
			CA 2295867 A1	15-01-1998
			DE 69708643 D1	10-01-2002
			DE 69708643 T2	01-08-2002
			EP 0912599 A1	06-05-1999
			ES 2170401 T3	01-08-2002
			WO 9801461 A1	15-01-1998
			US 6129924 A	10-10-2000
WO 9623811	A	08-08-1996	FR 2729956 A1	02-08-1996
			FR 2729957 A1	02-08-1996
			AU 4667096 A	21-08-1996
			WO 9623811 A1	08-08-1996
FR 2658186	A	16-08-1991	FR 2658186 A1	16-08-1991
US 5075336	A	24-12-1991	FR 2658816 A1	30-08-1991
			AU 7137691 A	29-08-1991
			CA 2036920 A1	28-08-1991
			EP 0445025 A2	04-09-1991
			IE 910641 A1	28-08-1991
			JP 4211631 A	03-08-1992
			OA 9481 A	15-11-1992
			PT 96889 A	31-10-1991
			ZA 9101401 A	27-11-1991